

УДК 632.4.01/08

**Т. А. Сурина, М. Б. Копина, О. В. Синкевич**

*Всероссийский центр карантина растений (ФГБУ «ВНИИКР»),  
140150, Россия, Московская область, г. Раменское,  
р.п. Быково, Пограничная ул., 32,  
t.a.surina@yandex.ru*

## **ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВАРИАБЕЛЬНЫХ УЧАСТКОВ ГЕНОВ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ КАРАНТИННЫХ ВИДОВ РОДА *PHYTOPHTHORA***

**Ключевые слова:** карантинные фитофторозы, диагностика, секвенирование, анализ последовательностей.

Карантинные для территории ЕАЭС фитофторозы включают в себя возбудителей болезней декоративных (*Phytophthora ramorum* Werres, De Cock & Man in 't Veld, *Phytophthora kernoviae* Brasier, Beales & S.A. Kirk) и ягодных культур (*Phytophthora fragariae* C.J. Hickman, *Phytophthora rubi* Man in t Veld). Традиционное определение возбудителей рода *Phytophthora* основано на изучении морфологических признаков, характере роста колоний на питательных средах. Существенным недостатком последнего метода является длительность его исполнения, а также сложность выделения возбудителей из растительного материала в чистую культуру. Кроме того, карантинные и некарантинные виды рода *Phytophthora* обладают очень схожей морфологией, что в лабораторной практике может привести к ложноположительным или ложноотрицательным результатам.

Одним из наиболее современных методов идентификации возбудителей фитофторозов является секвенирование последовательностей ДНК, которое позволяет быстро и достоверно идентифицировать оомицетов рода *Phytophthora* на любой стадии их развития. Чаще всего для баркодирования грибов и грибоподобных организмов используют регион ITS (внутренний транскрибируемый спейсер рибосомальной ДНК) [1]. Однако, как показали исследования, последовательность этого участка недостаточно изменчива и поэтому имеет ограниченное применение для межвидовой идентификации видов *Phytophthora*. В последнее время для идентификации фитофторозов начали активно использовать альтернативные ядерные (60S ribosomal protein L10,  $\beta$ -tubulin, enolase, HS protein 90, large subunit rRNA, TlgA gene fusion, translation elongation factor 1 $\alpha$ ) и митохондриальные (cox1, nad1, COX2, nad9, rps10, и SecY) локусы.

Для разработки высокоспецифичных тест-систем на карантинные виды рода *Phytophthora* нами были выбраны: ras-related protein (Ypt1) ген, субъединица I цитохром-с-оксидазы (COI, COX1), ген бета-тубулина (btub), ген фактора элонгации трансляции 1-альфа (EF1A), ген АТФ-синтазы белка 9 (atp9), ген энлазы (ENL), ген белка теплового шока 90 (HSP90), ген SecY (secY), ген рибосомного белка L10. Анализ последовательностей проводили с помощью программы BioEdit v. 7.0.5.3, основываясь на наименьшей комплементарности конкретного участка гена аналогичным участкам других видов фитофтор. Выбор целевых видов для анализа основывался на филогенетическом сходстве, морфологических признаках и растениях-хозяевах.

Субъединица I цитохром-с-оксидазы (COI, COX1) это кодируемый митохондриями ген. Цитохромоксидаза присутствует во внутренней мембране митохондрий всех эукариот, а также

в клеточной мембране многих аэробных бактерий. Анализ нуклеотидных последовательностей выбранных видов по данному гену показал небольшую вариабельность данного участка.

Для молекулярной идентификации грибов методом секвенирования широко используют гены бета-тубулина (btub)) и фактора элонгации трансляции 1-альфа (EF1A). Для большинства патогенов эти участки позволяют отличать виды друг от друга, однако они не подходят для идентификации видов рода *Phytophthora*, так как не имеют больших отличий в последовательностях.

Анализ нуклеотидных последовательностей гена АТФ-синтазы белка 9 (atp9) близкородственных видов *Phytophthora* выявил много вариабельных участков. Аденозинтрифосфатсинтаза митохондриальной мембраны – это группа ферментов, относящихся к классу транслоказ, синтезирующих аденозинтрифосфат (АТФ) из аденозиндифосфата (АДФ) и неорганических фосфатов (рис. 1).

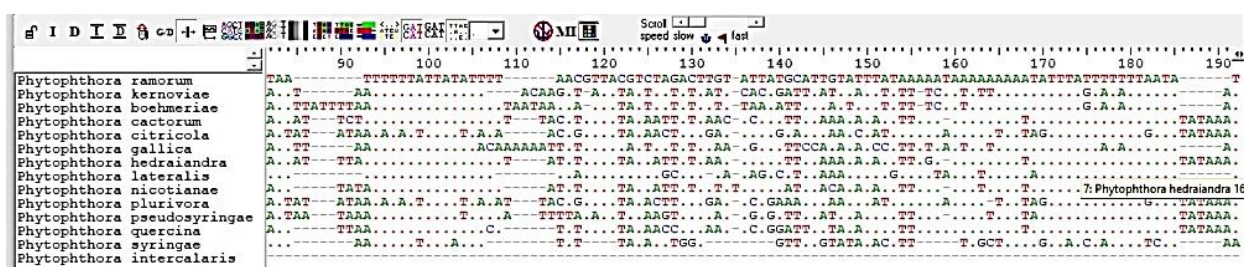


Рисунок 1. Выровненные последовательности по гену atp9

Анализ нуклеотидных последовательностей генов энолазы, белка теплового шока 90 и субъединицы белковой транслоказы SecY не выявил сильной изменчивости между видами.

Ras-related protein (Ypt1) ген регулирует доставку секреторных пузырьков из эндоплазматического ретикулума. Также участвует в переработке мембранных белков. Проведенный анализ последовательностей этого гена выявил несколько вариабельных участков, которые можно использовать для дизайна праймеров и зондов (рис. 2).

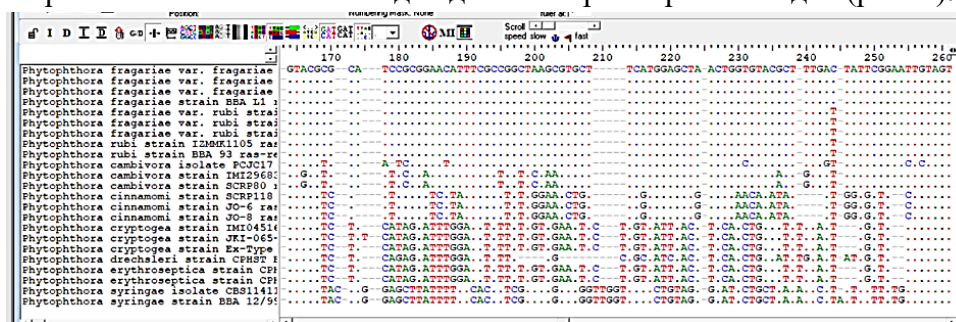


Рисунок 2. Анализ последовательностей гена Ypt1

Таким образом, проведенные исследования позволили выявить два гена (atp9, Ypt1), на основе которых можно разработать видоспецифичные тест-системы для идентификации карантинных видов *Phytophthora*.

### Список литературы

1. White T. J., Bruns T., Lee S., Taylor W. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press, San Diego. 1990. P. 135–156.